

(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

# PATENTSCHRIFT

ISSN 0433-6461

(11)

0153 495

Int.Cl.<sup>3</sup>

3(51) C 12 N 1/38

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 N/ 214 043

(22) 03.07.79

(45) 13.01.82

- (71) VEB PCK SCHWEDT; DD;  
WISS. ALLUNIONSFORSCHUNGSINST. F. D. BIOSYNTH. VON EIWEISSSTOFFEN, MOSKAU, SU  
(72) LUEBBERT, GUSTAV-ADOLF, DIPL.-CHEM.; REITER, URSULA; WIEGLEB, REINHARD, DIPL.-CHEM.;  
NIETZOLD, GISELA; DD;  
BAUCH, JOACHIM, DR. DIPL.-CHEM.; GENTZSCH, HERBERT, DR. DIPL.-ING.;  
RICHTER, HANS-JOACHIM, DIPL.-CHEM.; SCZEKALLA, BEATE, DR. DIPL.-CHEM.; DD;  
(73) VEB PCK SCHWEDT; DD;  
WISS. ALLUNIONSFORSCHUNGSINST. F. D. BIOSYNTH. VON EIWEISSSTOFFEN, MOSKAU, SU  
(74) DIPL.-CHEM. WERNER LEWNA, VEB PCK SCHWEDT, ABT. SCHUTZRECHTE UND LIZENZEN, 1330  
SCHWEDT

### (54) HILFSSTOFFKOMBINATION ZUR VERBESSERUNG MIKROBIOLOGISCHER VERFAHREN

(57) Die Erfindung betrifft eine Hilfsstoffkombination zur Verbesserung mikrobiologischer Verfahren, insbesondere aerober Prozesse, zur Gewinnung von mikrobiellem Eiweiß. Zur Verbesserung der Sauerstoffübertragungsleistung bei der aeroben Zucht von Mikroorganismen zur Gewinnung von Einzellerprotein auf der Basis von Kohlenwasserstoffen gibt es hinsichtlich der Verringerung des hohen Energie- und Apparatenaufwandes noch keine befriedigende Lösung des Problems. Entsprechend dem Stand der Technik werden der Fermentationsflüssigkeit zur Verbesserung der Sauerstoffübertragungsleistung Tenside oder Tensidkombinationen zugesetzt. Ueberraschenderweise wurde gefunden, daß durch Zusatz einer Hilfsstoffkombination der bekannten nichtionogenen tensidischen Stoffklasse der Äthylenoxid - Propylenoxidaddukte mit einem mittleren Molekulargewicht von 1200 - 3500 und der nichttensidischen Stoffklasse der Polyäthylenglycole mit einem mittleren Molekulargewicht von 150 - 5000 eine Steigerung der Biomassekonzentration um ca. 20 % erreicht werden kann. - Figur -

Titel der Erfindung

Hilfsstoffkombination zur Verbesserung mikrobiologischer  
Verfahren

---

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Hilfsstoffkombination zur Verbesserung mikrobiologischer Verfahren, insbesondere aerober Prozesse zur Gewinnung von mikrobiellem Eiweiß. Sie fällt vorrangig in das Gebiet der technischen Mikrobiologie. Die Erfindung kann aber auch auf anderen Gebieten genutzt werden, in denen Sauerstoff aus der Luft in ein wäßriges Medium überführt werden soll.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es sind zahlreiche aerobe Fermentationsverfahren zur Züchtung von Mikroorganismen mit dem Ziel der Zellkörpergewinnung sowie der Gewinnung biochemischer Reaktionsprodukte bekannt.

Typische Beispiele dafür sind großtechnische Verfahren der aeroben Züchtung von Mikroorganismen zur Einzellerproteingewinnung auf Basis von Kohlehydraten und Kohlenwasserstoffen als Kohlenstoffquelle.

Diese aeroben Verfahren sind alle durch einen hohen Sauerstoffbedarf des Fermentationsprozesses gekennzeichnet.

Der Sauerstoffbedarf wird in der Regel durch Zuführung von Luft und innige Dispergierung in das wäßrige Fermentationsmedium mittels verschiedener technischer Einrichtungen gedeckt. Damit ist die Sauerstoffversorgung des Fermentationsprozesses ein Energie- und apparateaufwendiger Prozeß.

Zur Verbesserung der Sauerstoffübertragungsleistung dieser technischen Systeme werden der wäßrigen Fermentationsflüssigkeit nichtionogene Tenside oder Tensidkombinationen zugesetzt. Der Stand der Technik ist hierzu in den folgenden Patentschriften beschrieben:

- (1) Gemäß der DD - Patentschrift Nr. 96722 werden Additionsprodukte aus Äthylenoxid und niederen aliphatischen Alkoholen oder Diolen sowie Alkylenkarbonsäuremethyлтаuride verwendet.
- (2) Nach DD - Patentschrift Nr. 104.099 wird eine Kombination eines nichtionogenen Tensides mit einem anionenaktiven Tensid als besonders günstig empfohlen. Das nichtionogene Tensid ist dabei ein Propylen - Äthylenoxid - Addukt mit 25 - 20 Molekülen Propylenoxid und 20 - 25 Molekülen Äthylenoxid. Als anionenaktives Tensid wird ein definiertes Alkylsulfonat eingesetzt.

- (3) Ferner ist nach DT - Offenlegungsschrift Nr. 1.442.296 der Socony Mobil Oil Inc. bekannt, daß Additionsprodukte aus Äthylenoxid mit Fettalkoholen, Fettamiden, Alkyl- und Arylgruppen sowie auch bestimmte Fettsäureester eingesetzt werden können.
- (4) Zur Verbesserung des Kontaktes zwischen Mikroorganismen und den Tröpfchen flüssiger Alkane werden für Verfahren der Kohlenwasserstofffermentation gemäß DT - Offenlegungsschrift 23 29 811 verschiedene Polyoxypropylenglykoläther vorgeschlagen.
- (5) In der DT - Offenlegungsschrift Nr. 2544625 wird zur Verbesserung der Züchtung und Abtrennung von Mikroorganismen bei der Fermentation von Erdöldestillatfraktionen nur ein Additionsprodukt aus Äthylenoxid und Propylenoxid verwendet.  
Bei diesem Verfahren wird in Kombination mit anderen Verfahrensschritten dieser Hilfsstoff gleichzeitig für die Abtrennung und günstige Beeinflussung der Reinigung der Biomasse genutzt.

Dieser dargelegte Stand der Technik hat folgende Nachteile:

In den Fällen (1), (3) und (4) müssen unterschiedliche Stoffklassen, wie Äthylenoxid, Propylenoxid sowie die entsprechenden Basiskomponenten (Alkohol, Säure, Amide usw.) zur Verfügung stehen. Dieser Sachverhalt verursacht stoff- und apparateaufwendige Herstellungstechnologien.

Im Verfahren gemäß (2) wird zwar ein Grundhilfsmittel verwendet, das nur aus Äthylenoxid und Propylenoxid her-

gestellt ist, die beste Wirkung sowohl als Fermentations- als auch als Trennhilfsmittel wird jedoch erst in Kombination mit der stark anionischen Tensidklasse der Alkylsulfonate erreicht.

Im Verfahren gemäß (5) wird ausschließlich ein Äthylenoxid- und Propylenoxidaddukt für die Fermentation und Trennung verwendet. Wie jedoch die breiten Untersuchungsbereiche und die relativ hohen Einsatzkonzentrationen gemäß dieser Schrift zeigen, wurde hier die Leistungsgrenze der Äthylen - Propylenoxidaddukte erreicht und ausgeschöpft.

#### Ziel der Erfindung

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, die geschilderten Nachteile gemäß (1) - (4) zu überwinden und die Leistungsfähigkeit der Äthylenoxid - Propylenoxidaddukte gemäß (5) weiter zu steigern ohne neue Grundstoffe für die Produktion des Hilfsmittels einzusetzen.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Die technische Aufgabe der Erfindung besteht darin, daß die innere Struktur des wäßrigen Kulturmediums bei Anwesenheit eines Äthylenoxid - Propylenoxidadduktes dahingehend zu beeinflussen ist, daß bessere Bedingungen für den Stoffaustausch Gas - Flüssigkeit - Mikroorganismen erzielt werden, ohne daß es zu Blockierungen der Grenzflächen kommt.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß diese Aufgabe durch Zusatz von Polyäthylenglycol erreicht werden kann. Polyäthylenglycol kann leicht aus Äthylenoxid hergestellt werden.

Polyäthylenglycol gehört nicht zur Stoffklasse der Tenside. Der erzielte positive Effekt in Kombination mit den nichtionischen Tensiden der Propylen - Äthylenoxidklasse wird durch eine optimale Beeinflussung der inneren Struktur der wäßrigen Kulturflüssigkeit infolge einer synergistischen Wirkung der Hydrathüllen sowohl am Äthylenoxid - Propylenoxidaddukt als auch des Polyäthylenglycols erreicht.

Wie in den nachfolgenden Beispielen gezeigt wird, besteht der positive Effekt dieser Hilfsmittelkombination darin, daß bei zusätzlicher Anwesenheit des Polyäthylenglycols mit einem mittleren Molekulargewicht von 150 - 5000 eine Steigerung der Sauerstoffübertragungsleistung erzielt oder eine Senkung des Bedarfs an Äthylenoxid - Propylenoxidaddukt für die Fermentation oder nach Verfahren (5) auch für die Trennung erreicht wird.

#### Ausführungsbeispiele

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand der nachfolgenden Beispiele erläutert:

##### Beispiel 1

Zur Ermittlung der Verbesserung des Sauerstoffübertragungskoeffizienten durch die Hilfsstoffkombination wurden folgende Versuche durchgeführt:

Das Versuchsprinzip bestand darin, daß mit  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  sauerstofffrei gemachte Wasserproben mit je 100 mg/l der jeweiligen Hilfsstoffkombination versehen wurden und mittels einer  $\text{pO}_2$  Meßsonde die Aufsättigungszeit mit Sauerstoff dieser Lösung unter definierten Bedingungen, d. h. normierter Oberflächenbelüftung gemessen wurde.

Diese gemessene Zeit wurde ins Verhältnis zur Aufsättigungszeit der reinen, d. h. kein Tensid enthaltende, sauerstofffreien Wasserprobe gesetzt. Es wurde gefunden, daß die Aufsättigungszeiten (50 % Punkt), die bei Zugabe von 100 mg/l Propylenoxid - Äthylenoxid im Molekulargewichtsbereich von 1200 - 3500 40 - 60 % der des reinen Wassers betrug, überraschenderweise auf 10 - 30 % gesenkt werden konnten, wenn in diesen Addukten 2-20 % Polyäthylenglycol im Molekulargewichtsbereich von 150 - 5000 enthalten war.

### Beispiel 2

Die Sättigungszeitmessung durch Oberflächenbelüftung kann jedoch nur ein Anhaltspunkt für die Wirksamkeit von Hilfsstoffen in technischen Fermentationsprozessen sein. Eine lineare Verbesserungsrate, analog der Oberflächenbelüftung, ist bei technisch aeroben Fermentationsprozessen bekanntermaßen nicht erreichbar, da wesentliche zusätzliche Faktoren wirksam werden, z. B.

- begrenzte spezifische Belüftungsrate der Fermentationsgemische wegen Schaumbildung oder Erreichung des Überflutungspunktes
- Einflüsse der Mikroorganismen und der Stoffwechselprodukte.

Aus diesem Grunde wurde eine Verbesserung der Wirkung an einem Verfahrensbeispiel gemäß (5) überprüft. Gemäß diesem Verfahren wird *Candida guilliermondii* auf Erdöldestillat gezüchtet und mit dem gleichen Hilfsstoff vom Erdöldestillat zur Gewinnung von mikrobiellem Eiweiß getrennt. Zu diesem Zweck wurde in einem 500 l Fermentor *Candida guilliermondii* in bekannter Weise kontinuierlich gezüchtet.

Dem Fermentationsmedium wurde 0,1 g/l des bekannten Äthylenoxid - Propylenoxidadduktes mit einem mittleren Molekulargewicht von 2100 zugegeben, das 5,2 % Polyäthylenglycol mit einem mittleren Molekulargewicht von 380 enthielt. Die erzielten verbesserten Biomassekonzentrationen im Vergleich zur Züchtung ohne Hilfsmittelzusatz sind in der folgenden Übersicht angegeben.

Die spezifische Durchflußrate und Belüftungsrate, der Leistungseintrag durch das Rührwerk und die Dosierung der Nähr- und Spurenkomponente wurde über alle Versuche konstant gelassen.

spezifische Belüftungsrate	= 100 l Luft/1 kg Fermentationsflüssigkeit und Stunde
spezifischer Leistungseintrag	= 2,3 W/kg Fermentorflüssigkeit
spezifische Durchflußrate	= 0,2 h <sup>-1</sup>



ohne Hilfsmittel	9,6 g Hefetrockensubstanz/kg Fermentorflüssigkeit
mit Äthylenoxid - Propylenoxidaddukt	10,1 g Hefetrockensubstanz/kg Fermentorflüssigkeit
mit Äthylenoxid - Propylenoxidaddukt + Polyäthylenglycol	12,3 g Hefetrockensubstanz/kg Fermentorflüssigkeit

Unter Anwendung des erfindungsgemäßen Hilfsmittelgemisches wurde also eine Steigerung der Biomassekonzentration um etwa 20 % erreicht.

Dem aus dem Fermentor kontinuierlich entnommenen Fermentationsgemisch wurden nochmals 300 mg des o. g. Äthylenoxid - Propylenoxidadduktes + Polyäthylenglycol zugegeben, auf 80 °C erwärmt und in einem kontinuierlich arbeitenden Separator das Erdöldestillat bis auf einen Restgehalt von 0,6 % in der Hefephase abgetrennt.

Auch bei der Ölabtrennung wurde somit eine bessere Wirkung der Hilfsstoffkombination im Bereich niedriger Konzentrationen erreicht.

Analog gute Ergebnisse wurden in weiteren Versuchen erreicht, in denen Hilfsstoffkombinationen mit einem Polyäthylenglycolgehalt bis zu 20 Gewichtsprozent und Molekulargewichten bis zu 5000 verwendet wurden.

### Erfindungsanspruch

Hilfsstoffkombination zur Verbesserung mikrobiologischer Verfahren, insbesondere von mikrobiellem Eiweiß, gekennzeichnet dadurch, daß die Hilfsstoffkombination aus einer Mischung der bekannten nichtionogenen oberflächenaktiven Stoffklasse der Äthylenoxid - Propylenoxidaddukte mit einem mittleren Molekulargewicht von 1200 - 3500 und der nichttensidischen Stoffklasse der Polyäthylenglycole mit einem mittleren Molekulargewicht von 150 - 5000 besteht, wobei das nichttensidische Polyäthylenglycol in einer Menge von 0,5 - 20 Gewichtsprozent, bezogen auf das Äthylenoxid - Propylenoxidaddukt, eingesetzt wird.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**